

孔杰,周洲,刘伟,等. 达氏鳊亲鱼群体 mtDNA *Cyt b* 基因和 D-loop 区的序列特征及遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(3): 40-42.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.03.009

# 达氏鳊亲鱼群体 mtDNA *Cyt b* 基因和 D-loop 区的序列特征及遗传多样性分析

孔杰,周洲,刘伟,赵凤,王金乐

(贵州省农业科学院水产研究所,贵州贵阳 550025)

**摘要:**通过对线粒体细胞色素 b(*Cyt b*) 基因和控制区(D-loop) 进行序列特征和遗传多样性检测,分析达氏鳊(*Huso dauricus*) 亲鱼群体 30 个个体的序列特征及遗传多样性。结果表明,*Cyt b* 基因长 1 138 bp,G + C 含量为 47.03%,共定义单倍型 5 个、多态性位点(S)2 个,简约信息位点 1 个,单倍型多样性指数( $H_d$ ) 为 0.372,平均核苷酸差异数( $K$ ) 为 0.384,核苷酸多样性指数( $\pi$ ) 为 0.000 34;D-loop 区序列全长 845 bp,G + C 含量为 37.41%,共定义单倍型 6 个,多态性位点 8 个,简约信息位点 3 个,单倍型多样性指数为 0.424,平均核苷酸差异数为 1.069,核苷酸多样性指数为 0.001 27。基于线粒体 D-loop 与 *Cyt b* 序列的研究结果表明,养殖达氏鳊亲鱼群体的遗传多样性偏低,在利用达氏鳊亲鱼进行繁殖育苗时要注意近交的影响。

**关键词:**达氏鳊;mtDNA;D-loop;*Cyt b*;遗传多样性

**中图分类号:**S917.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)03-0040-03

达氏鳊(*Huso dauricus*) 隶属于硬骨鱼纲辐鳍亚纲鲟科鲟亚科鳊属,是我国重要的大型经济鱼类之一。鲟形目鱼类属于多倍体起源鱼类,种间极易杂交,易造成种质混乱现象,产生种质退化风险。在养殖中,许多单位将自养鲟鱼留作苗种,长期以来忽略了亲鱼选育的遗传背景问题,使得养殖群体近

交的风险增大<sup>[1]</sup>。因此,为了抑制养殖群体的种质退化,保证亲鱼群体的遗传力,防止近交衰退造成后代出现成活率降低、长速减慢等问题,有必要了解后备亲鱼群体的遗传多样性。

线粒体 DNA(mitochondrial DNA,简称 mtDNA) 具有母系遗传、变异率高、进化速度快、无组织特异性的特点,被广泛应用于水生动物的遗传多样性和分子鉴定研究中,如鲫鳊鱼<sup>[1-2]</sup>、鲤<sup>[3]</sup>的分子鉴定,鲟鱼<sup>[4-6]</sup>、沼虾<sup>[7-8]</sup>、裂腹鱼<sup>[9-10]</sup>等的遗传多样性研究。mtDNA 的不同区域进化速度存在差异,其中,D-loop 区位于 tRNA<sup>Pro</sup> 和 rRNA<sup>Pbc</sup> 基因之间的控制区,不参与编码蛋白,是整个 mtDNA 上序列和长度变异最大的区

收稿日期:2017-11-07

基金项目:贵州省科研机构服务企业行动计划(编号:黔科合平台人才[2016]5714);贵州省科技计划(编号:黔科合支撑[2016]2584);现代农业产业技术体系专项资金(编号:CARS-46)。

作者简介:孔杰(1986—),女,贵州贵阳人,硕士,助理研究员,主要从事水产生物技术相关研究。E-mail:kellykj@126.com。

programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows[J]. *Molecular Ecology Resources*,2010,10(3):564-567.

[16]He S P,Liu H Z,Chen Y Y,et al. Molecular phylogenetic relationships of Eastern Asian Cyprinidae (Pisces: Cypriniformes) inferred from cytochrome b sequences[J]. *Science in China Series C - Life Sciences*,2004,47(2):130-138.

[17]Hebert P D,Cywinska A,Ball S L,et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. *Proceedings. Biological Sciences / the Royal Society*,2003,270(1512):313-321.

[18]Schlei O L,Crete - Lafreniere A,Whiteley A R,et al. DNA barcoding of eight North American coregonine species[J]. *Molecular Ecology Resources*,2008,8(6):1212-1218.

[19]唐伟,朱治任,汪财生,等. 基于 *COI* 基因的 DNA 条形码在鳖科动物鉴定上的应用[J]. *江苏农业科学*,2017,45(6):30-36.

[20]Hebert P D,Stoeckle M Y,Zemlak T S,et al. Identification of birds through DNA barcodes[J]. *PLOS Biology*,2004,2(10):1657-1663.

[21]施立明. 遗传多样性及其保存[J]. *生物科学信息*,1990,2(4):158-164.

[22]王伟,陈立侨,禹娜,等. 应用 *CO II* 基因部分序列分析翘嘴鲌群体的遗传多样性[J]. *大连水产学院学报*,2008,23(5):403-408.

[23]Grant W S,Bowen B W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation[J]. *Journal of Heredity*,1998,89(5):415-426.

[24]He D K,Kang Z J,Tao J,et al. Hydrologic connectivity driven natural stream fish assemblages in mountain streams in the Yangtze River basin: implications for stream fish conservation in monsoonal East Asia[J]. *Hydrobiologia*,2017,785(1):185-206.

[25]李修峰,黄道明,谢文星. 汉江中游产漂流性卵鱼类产卵场的现状[J]. *大连海洋大学学报*,2006,21(2):105-111.

[26]谢文星,黄道明,谢山,等. 丹江口水利枢纽建成后汉江中下游四大家鱼等早期资源及其演变[J]. *水生态学杂志*,2009,2(2):44-49.

域,进化速度快,适用于亲缘关系较近的群体间的比较研究和种群水平的差异检测<sup>[11-12]</sup>; *Cyt b* 基因是编码基因,进化速度适中,适合鱼类的种间、种内遗传分化研究<sup>[12-13]</sup>。结合 *Cyt b*、D-loop 2 种分子标记可以更准确地进行鱼类种内遗传变异分析。

本研究以达氏鳊亲鱼群体为研究对象,开展 mtDNA *Cyt b* 基因和 D-loop 的序列对比分析,探讨 2 种标记用于达氏鳊遗传多样性分析的优缺点,旨在研究达氏鳊后亲鱼群体的遗传多样性,为达氏鳊遗传选育提供数据参考。

## 1 材料与与方法

### 1.1 试验材料

2017 年 3 月于贵州省水产研究所惠水试验基地采集达氏鳊亲鱼群体 30 尾。剪取尾鳍,固定于无水乙醇中,于 4 °C 保存备用。

### 1.2 基因组提取及扩增

剪取质量约为 50 mg 鲟鱼鳍条样本,加液氮研磨组织后,用磁珠法基因组 DNA(动物)抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]进行 DNA 提取,DNA 的质量与浓度用琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop Lite(Thermo Scientific)紫外分光光度计进行测定。

用于扩增目的片段 *Cyt b* 的引物:*Cytb*-F,5'-GTGACTTGAAAAACCACCGTTG-3';*Cytb*-R,5'-CTCCATCTCCGGTTTAC AAGAC-3'。用于扩增 D-loop 区序列的引物:*tpro*-F1,5'-AACTCCCAAAGCTAAGATTC-3';*tphe*-R2,5'-ATCCTTTAAGT TAAAGCTACGC-3'。PCR 反应总体积为 50  $\mu$ L,含有 100 ng 模板 DNA,25  $\mu$ L Premix *Taq*,各 1  $\mu$ L 上下游引物(10  $\mu$ mol/L),加无菌水补足总体积为 50  $\mu$ L。PCR 扩增程序:95 °C 4 min; 95 °C 45 s,54 °C/56 °C(D-loop/*Cyt b*) 45 s,72 °C 90 s/2 min(D-loop/*Cyt b*),35 个循环;72 °C 延伸 8 min。PCR 扩

增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

### 1.3 数据分析

用 MEGA 6.0 软件进行同源比对和长度确定,并统计 DNA 序列的碱基组成,转换/颠换、插入/缺失位点数,多态性位点数(S),单突变位点,简约信息位点和平均转换/颠换率。用 DnaSP 5.0 软件统计单倍型数量(*h*)、单倍型多样性指数( $H_d$ )、核苷酸多样性指数( $\pi$ )、平均核苷酸差异数(*K*)和 Tajima's *D* 值等遗传多样性参数。

## 2 结果与分析

### 2.1 达氏鳊 *Cyt b* 基因和 D-loop 序列的特征及遗传变异

测序获得的 30 尾达氏鳊 *Cyt b* 基因序列的全长为 1 138 bp,定义了 5 个单倍型。用 MEGA 6.0 软件对 *Cyt b* 基因序列进行分析显示,检测到多态位点 2 个,其中简约信息位点 1 个,单突变位点 1 个,为颠换位点(T $\rightarrow$ C)。在 30 个个体的 *Cyt b* 基因中,A、T/U、C、G 碱基的平均含量分别为 26.96%、26.01%、31.82%、15.21%,A+T 的含量(52.97%)明显高于 G+C 的含量(47.03%),基于最大似然法估算的转换/颠换比为 0.472。

测序获得 30 尾达氏鳊 D-loop 区序列的全长为 845 bp,定义了 6 个单倍型。用 MEGA 6.0 软件对 D-loop 区进行分析显示,检测到多态位点 8 个,其中简约信息位点 3 个,单突变位点 5 个,但多态位点中转换位点 2 个,颠换位点 3 个。基于最大似然法估算的转换/颠换比为 2.162。30 个个体的 D-loop 中,A、T/U、C、G 碱基的平均含量分别为 30.28%、32.31%、14.92%、22.49%,A+T 的含量(62.59%)明显高于 G+C 的含量(37.41%)。对比分析可知,*Cyt b* 的简约信息位点数、变异位点数、转换/颠换位点数及单突变位点数均比 D-loop 少,详见表 1。

表 1 达氏鳊线粒体 *Cyt b* 基因和 D-loop 序列碱基组成及变异分析

基因序列	简约信息位点数量 (个)	单突变数量 (个)	转换位点数量 (个)	颠换位点数量 (个)	转换/颠换值 ( <i>R</i> 值)	碱基含量(%)				
						A	T/U	C	G	G+C
<i>Cyt b</i>	1	1	0	1	0.472	26.96	26.01	31.82	15.21	47.03
D-loop	3	5	2	3	2.162	30.28	32.31	14.92	22.49	37.41

注:表中的 *R* 值是基于最大似然法计算的。

### 2.2 基于 *Cyt b* 基因和 D-loop 序列的遗传多样性分析

基于 *Cyt b* 基因的达氏鳊亲鱼养殖群体的多态性位点数为 2 个,单倍型数量为 5 个,单倍型多样性指数为 0.372,核苷酸多样性指数为 0.000 34,平均核苷酸差异为 0.384,

Tajima's *D* 值为 -1.613 75。基于 D-loop 序列的达氏鳊亲鱼养殖群体多态性位点数为 8 个,单倍型数量为 6 个,单倍型多样性指数为 0.424,核苷酸多样性指数为 0.001 27,平均核苷酸差异数为 1.069,Tajima's *D* 值为 -1.576 74(表 2)。

表 2 基于 *Cyt b* 基因和 D-loop 序列的达氏鳊遗传多样性参数

基因序列	单倍型数量 (个)	单倍型多样性指数	多态位点数量 (个)	核苷酸多样性指数	平均核苷酸差异数	Tajima's <i>D</i> 值
<i>Cyt b</i>	5	0.372	2	0.000 34	0.384	-1.613 75
D-loop	6	0.424	8	0.001 27	1.069	-1.576 74

## 3 讨论

### 3.1 达氏鳊群体的 mtDNA *Cyt b* 和 D-loop 序列组成特征

4 种碱基组成含量不均一是动物线粒体基因组的共性,G+C 含量在 21%~50% 之间,其中脊椎动物的 G+C 含量为 37%~50%<sup>[14]</sup>。然而,碱基 A+T 含量高的线粒体基因在进

化中更具优势<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,达氏鳊群体 *Cyt b*、D-loop 全序列的 G+C 含量分别为 47.03%、37.41%,显著低于其 A+T 含量 52.97%、62.59% ( $P < 0.01$ ),且 D-loop 的 A+T 含量比 *Cyt b* 高近 10%,表明达氏鳊群体与其他水生动物,如粗唇鲮<sup>[16]</sup>、鲫<sup>[17]</sup>、香鱼<sup>[18]</sup> 的线粒体核苷酸碱基含量相似。在本研究中,*Cyt b* 基因的多态性位点数量(2 个)低于

D-loop区(8个), *Cyt b*基因的简约信息位点数量(1个)低于D-loop区(3个),也再一次证明了D-loop的进化速率比*Cyt b*快,这是由于*Cyt b*基因是蛋白质的编码基因,而D-loop是一段非编码区,与线粒体基因调控有关,进化压力较小。

从30条长1138 bp的达氏鲤*Cyt b*序列中共检测到2个突变位点,占总分析位点数的0.2%。从30条长845 bp的D-loop序列中共检测到8个突变位点,占总分析位点数的0.9%。在生物体的进化中,颠换不断积累,因此转换/颠换值不断降低,一般认为转换/颠换值小于2时,基因序列突变已经达到饱和状态<sup>[19]</sup>。在本研究中,基于最大似然法计算*Cyt b*、D-loop的转换/颠换值(*R*值)分别为0.472、2.162, *Cyt b*的*R*值小于2, D-loop的*R*值略大于2,表明*Cyt b*发生的突变已经达到饱和,而D-loop还有进一步突变的空间。由此可见, D-loop更适合用来进行达氏鲤的种内遗传分析。

### 3.2 达氏鲤亲鱼群体遗传多样性的分析

单倍型多样性指数及核苷酸多样性指数是衡量种群遗传变异的重要指标,其数值越大,代表种群遗传多样性越丰富<sup>[20]</sup>,遗传多样性越丰富,该物种对环境变化的适应能力越强<sup>[21]</sup>。由于核苷酸多样性指数考虑了各种单倍型在种群中所占的比例,因此在衡量一个种群的多态性程度时,比单纯的单倍型多样性指数要准确, $\pi$ 值高,则说明种群的遗传多样性较高<sup>[22]</sup>。牛翠娟等通过D-loop序列对达氏鲤群体的遗传多样性进行分析,结果显示,单倍型多样性指数为0.507,核苷酸多样性指数为0.002,并得出遗传多样性偏低的结论<sup>[6]</sup>。王巍等对4种鲟鱼的遗传多样性分析的结果显示,施氏鲟( $\pi=0.002$ ,  $H_d=0.608$ )、小体鲟( $\pi=0.010$ ,  $H_d=0.572$ )、西伯利亚鲟( $\pi=0.005$ ,  $H_d=0.706$ )、俄罗斯鲟( $\pi=0.005$ ,  $H_d=0.352$ )4种后亲鱼群体的遗传多样性偏低<sup>[5]</sup>。从其他鱼类的遗传多样性来看,香鱼群体D-loop的 $\pi=0.00199$ ,  $H_d=0.81075$ , *Cyt b*的 $\pi=0.00028$ ,  $H_d=0.323$ ,遗传水平较低<sup>[18]</sup>;赤眼鲟野生群体D-loop的 $\pi=0.0284$ ,  $H_d=0.963$ , *Cyt b*的 $\pi=0.0426$ ,  $H_d=0.9710$ ,赤眼鲟群体具有较高的遗传多样性水平<sup>[12]</sup>。本研究基于mtDNA *Cyt b*基因、D-loop序列,研究达氏鲤亲鱼群体的遗传多样性,结果显示, *Cyt b*的核苷酸多样性指数、单倍型多样性( $\pi=0.00034$ ,  $H_d=0.372$ )和D-loop的核苷酸多样性指数、单倍型多样性指数( $\pi=0.00127$ ,  $H_d=0.424$ )均低于以上各种鱼类的相应遗传参数,表明本研究中的30尾达氏鲤亲鱼群体的遗传多样性较低。本研究结果初步反映了达氏鲤亲鱼群体的遗传背景、遗传结构及遗传变异水平,可以采用核基因组分子标记如简单重复序列(SSR)、单核苷酸多态性(SNP)等联合分析,以更全面地展示该群体的遗传多样性,为亲鱼选育、苗种培育提供理论依据。

### 参考文献:

- [1]郭向贺. 五种鲟鲤鱼种质鉴定及遗传多样性分析[D]. 保定:河北农业大学,2014:73.
- [2]胡佳,汪登强,危起伟,等. 施氏鲟、达氏鲤及其杂交子代的分子鉴定[J]. 中国水产科学,2010,17(1):21-30.
- [3]苏胜彦,董在杰,朱文彬. 4个线粒体基因在鲤所属国家种质鉴定中的应用及效果评价[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2017,38(1):45-51.
- [4]向燕,孔杰,周洲,等. 鲟鱼养殖亲鱼群体遗传多样性分析[J]. 西南农业学报,2013,26(5):2112-2115.
- [5]王巍,朱华,胡红霞. 4种鲟鱼养殖亲鱼群体遗传多样性分析[J]. 动物学杂志,2012,47(1):105-111.
- [6]牛翠娟,胡红霞,罗静,等. 史氏鲟和达氏鲤养殖亲鱼群体遗传多样性分析[J]. 水产学报,2010,34(12):1795-1799.
- [7]董新培,武小斌,万海付,等. 河北3个日本沼虾野生群体线粒体DNA D-Loop基因序列变异及种群遗传结构分析[J]. 水产学报,2017,41(2):182-188.
- [8]杨频,张浩,陈立桥,等. 利用COI基因序列分析长江与澜沧江水系日本沼虾群体的遗传结构(英文)[J]. 动物学研究,2007,28(2):113-118.
- [9]张争世,胡冰洁,叶祥益,等. 基于mtDNA *Cyt b*序列分析齐口裂腹鱼群体遗传多样性[J]. 水生生物学报,2017,41(3):609-616.
- [10]孟玮,郭焱,海萨,等. 塔里木裂腹鱼群体遗传结构及遗传多样性分析[J]. 水生生物学报,2012,36(5):851-857.
- [11]黄志坚,徐晓鹏,唐晶晶,等. 淡水鱼类线粒体DNA D-loop基因的引物设计及应用[J]. 中山大学学报(自然科学版),2009,48(4):84-88.
- [12]杨慧荣,赵会宏,蒙子宁,等. 赤眼鲟线粒体D-loop和*Cyt b*基因序列的对比分析[J]. 中山大学学报(自然科学版),2012,51(5):100-106,136.
- [13]马亚,岳志芹,赵玉然,等. 松江鲈鱼*Cyt b*基因序列分析及种质鉴定[J]. 生物技术通报,2012(8):119-124.
- [14]黄原. 分子系统学——原理,方法及应用[M]. 北京:中国农业出版社,1998:65.
- [15]Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994,3(5):294-299.
- [16]刘伟,代应贵,袁振兴,等. 都柳江粗唇鲟种群线粒体DNA *Cyt b*基因和D-loop序列组成及遗传多样性[J]. 淡水渔业,2016,46(3):10-15,51.
- [17]胡玉婷,胡王,凌俊,等. 滁州鲫线粒体细胞色素b基因和控制区序列比较及其系统进化分析[J]. 南方水产科学,2015,11(2):101-108.
- [18]李娜,陈少波,谢起浪,等. 闽浙地区香鱼线粒体*Cyt b*基因和D-loop区序列多态性分析[J]. 遗传,2008,30(7):919-925.
- [19]吴静,张研,霍堂斌,等. 利用线粒体序列分析黑龙江和松花江流域乌苏里拟鲿种群遗传结构[J]. 淡水渔业,2013,43(2):16-20.
- [20]张久盘. 基于mtDNA *Cyt b*基因和D-loop祁连山裸鲤遗传多样性及分类地位分析[D]. 兰州:甘肃农业大学,2015:43.
- [21]Knight A, Mindell D P. Substitution bias, weighting of DNA sequence evolution, and the phylogenetic position of Fea's viper [J]. Systematic Biology, 1993,42(1):18-31.
- [22]Zhou H, Li D, Zhang Y, et al. Study on mitochondrial DNA genetic diversity of Tibetan antelope [J]. Hereditas, 2006,28(3):299-305.